中华蜜蜂 Orco 嗅觉受体基因的克隆、表达及亚细胞定位

张林雅[1]，谢冰花[2]，倪翠侠[1]，赵　磊[1]，李红亮[1,*]，商晗武[1]
(1. 中国计量学院生命科学学院，浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室，杭州 310018；
2. 杭州师范大学生命与环境科学学院，杭州 310036)

摘要：【目的】克隆鉴定中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 的 Orco 嗅觉受体基因，并对其在工蜂触角上进行免疫荧光定位。【方法】利用 RT-PCR 技术克隆中华蜜蜂 Orco 基因，并对其编码的氨基酸序列进行生物信息学分析，使用 Real-time PCR 技术鉴定其在中华蜜蜂不同发育时期及不同组织的表达谱；利用免疫荧光定位技术在中华蜜蜂工蜂触角中对 Orco 进行亚细胞定位。【结果】获得中华蜜蜂 Orco 基因的全长 cDNA 序列，命名为 *AcerOrco* (GenBank 登录号：JF968610.1)，其全长为 1 434 bp，编码 477 个氨基酸，预测其含 7 个跨膜结构以及 4 个位于细胞膜外的亲水区。表达谱分析显示，*AcerOrco* 在卵、幼虫和蛹期呈低丰度表达，1 日龄及内勤蜂时期主要在触角和足中表达，且在 1 日龄的触角中表达量最高；采集蜂时期的触角、头(去除触角)、胸、腹和翅中均有较高丰度的表达。亚细胞定位结果显示，AcerOrco 不仅在采集蜂触角鞭节上大量表达(尤其在触角鞭节第 1 亚节中表达量较高)，而且常成对出现，并且发现 AcerOrco 可能主要在触角毛形感器的外部神经元(outer dendrite, OD)以及板形感器的树突神经元中表达。【结论】成功克隆了 AcerOrco 基因全长，获得了其表达谱，且将其定位于工蜂采集蜂的触角感器神经元上，最终推测 AcerOrco 与中蜂嗅觉发育和触角感器功能密切相关。

关键词：中华蜜蜂；气味受体；表达谱分析；触角感器；免疫荧光定位
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2012)11-1246-09

Cloning, expression and subcellular localization of the olfactory co-receptor Orco gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymentoptera: Apidae)

ZHANG Lin-Ya[1], XIE Bing-Hua[2], NI Cui-Xia[1], ZHAO Lei[1], LI Hong-Liang[1,*], SHANG Han-Wu[1]
(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2. College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract: 【Aim】 To clone and identify the olfactory receptor co-receptor (Orco) gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*, and locate its proteins in the worker's antennae. 【Methods】 The olfactory receptor Orco gene from honeybee *A. cerana cerana* was cloned by RT-PCR, and the expression of this gene at different developmental stages and in different tissues of the honeybee were profiled by Real-time PCR. The putative amino acid sequence was analyzed by bioinformatics methods, and the sub-cellular localization of Orco in the worker's antennae was detected by immunofluorescence. 【Results】 The full-length cDNA sequence of olfactory receptor Orco was obtained from *A. cerana cerana*, and named as *AcerOrco* (GenBank accession no. JF968610.1). Its open reading frame is 1 434 bp in length, encoding 477 amino acid residues. Homology analysis showed that the amino acid sequences of AcerOrco contain seven-transmembrane domains and four hydrophilic regions outside the membrane. The expression profiling at different developmental stages showed that *AcerOrco* was expressed in the egg, larval and pupal periods at very low levels. The expression profiling in different tissues revealed that *AcerOrco* was highly expressed in the antennae and legs in nurse bee, with the highest level in the antennae of the 1 day-old worker, while in forager it was highly expressed in antennae, head (without antennae), thorax,

---

基金项目：国家自然科学基金项目(30900163)
作者简介：张林雅，女，1988 年 10 月生，江西上饶人，硕士研究生，研究方向为昆虫生化分子生物学与化学生态学，E-mail：zoezhanglinya@yahoo.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: hlli@cjlu.edu.cn
收稿日期 Received: 2012-10-18；接受日期 Accepted: 2012-11-18

abdomen and wings. Subcellular localization displayed that AcerOrco was largely expressed in pairs in the antenna of forager, especially in the 1st flagellar segment of antenna. Furthermore AcerOrco was seemingly to be mainly expressed in the outer dendrite (OD) neurons of sensilla trihodea and the dendrites of sensilla placodea in antennae. 【Conclusion】The full-length olfactory receptor gene *AcerOrco* and its expression profiles were obtained, and the encoded protein in the forager antenna of worker honeybee was successfully localized using immunofluorescence. It is inferred that AcerOrco is closely related with the olfactory development and functions of antennal sensilla in the honeybee.

Key words: *Apis cerana cerana*; olfactory receptor; expression profiling; antennal sensilla; immunofluorescence localization

昆虫通过复杂的嗅觉系统来感知和鉴别外界环境中的化学气味分子，以维持其正常的觅食、求偶、繁殖和避害等生理行为。在昆虫的嗅觉器官(如触角)的嗅觉感器中包含了许多重要的信号识别和传递分子，如气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)和嗅觉受体(olfactory receptors, Ors)等(Pelosi *et al*., 2006)。环境中的气味分子经昆虫触角嗅觉感器内淋巴液中的 OBPs 和 CSPs 等结合蛋白运载后，与嗅觉神经元(olfactory sensory neurons, OSNs)树突膜上的 Ors 进行识别和作用，同时产生动作电位，并最终在中枢神经中形成指令(Rützler and Zwiebel, 2005)。

由于 Ors 是引起嗅觉神经元细胞膜通透性发生改变，继而引起嗅觉反应的重要传递介质，所以 Ors 是揭示昆虫嗅觉系统功能的重要基础和前提(Su *et al*., 2009)。自 1999 年从黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中鉴定出第一个昆虫嗅觉受体以来(Vosshall *et al*., 1999)，随着基因组学技术的快速发展，已经获得至少 15 种昆虫的全基因组序列，从中鉴定出多个嗅觉受体(Sánchez-Gracia *et al*., 2009)。这些昆虫嗅觉受体可分为传统型嗅觉受体(conventional Ors)和非传统型气味受体(atypical Ors)[即 Orco 受体家族(olfactory receptor co-receptor family)]两类(Mombaerts, 1999; Vosshall and Hansson, 2011)，这两类昆虫嗅觉受体分子都是七次跨膜蛋白，并且与哺乳动物有明显的不同，它们的蛋白 N 端位于细胞膜内而 C 端在细胞膜外(Lundin *et al*., 2007)。传统型的 Ors 在不同昆虫间的同源性很低，具有高度的多样性，而 Orco 受体家族在不同昆虫种间则具有非常高的保守性。通过对果蝇的 DmelOrco 基因敲除实验，证实 Orco 对昆虫的嗅觉行为有重要的调节和辅助作用(Larsson *et al*., 2004)，所以近些年来已经愈来愈受到关注，如在双翅目(Xia and Zwiebel, 2006)、鳞翅目(王桂荣等, 2005; 修伟明等, 2010; Qiao *et al*., 2010; 李珣等, 2011)以及膜翅目(Lu *et al*., 2009)等昆虫中已经对其进行了初步研究。

蜜蜂是一种典型的社会性昆虫，在黑暗的蜂巢中，个体之间除依靠接触、声音、舞蹈动作进行通讯联系外，有序维持整个蜂群的生活、繁殖等活动的很多信息是通过嗅觉识别气味来传递的。在西方蜜蜂 *Apis mellifera* 中鉴定出 163 个 Ors 和 7 个假基因 Ors，对这些 Ors 基因的研究发现 Ors 基因在区分蜜蜂的种、性别、驱使蜜蜂执行各自的社会功能以及蜜蜂如何检测信息素类物质和寻找花源上都提供重要的线索(Robertson and Wanner, 2006)。中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius(简称中蜂)，是我国特有的蜜蜂品种，中蜂具有非常灵敏的嗅觉系统、抗寒以及适应性强等优点，善于利用零星蜜粉源(颜伟玉等, 2009)，可以对中国山区和低温开花的植物进行授粉等，如蔷薇科、山茶科和十字花科等都是依赖中蜂授粉而得以繁衍的，所以中蜂在维系我国动植物生态平衡上有着极其重要的作用。中蜂灵敏的嗅觉是它的这些优越性的重要体现。因此，对中蜂的嗅觉系统进行深入研究有着重要意义。为了研究中蜂的嗅觉机理，本实验室在前期已经对一些气味结合蛋白(Li *et al*., 2008, 李红亮等, 2008)和化学感受蛋白(Li *et al*., 2007, 李红亮等, 2010, 2011)进行了感器定位和功能研究。在此基础上，本研究利用 RT-PCR 技术对中蜂 Orco 嗅觉受体基因进行了克隆以及不同发育时期和组织表达谱进行了鉴定，并用免疫荧光定位技术对其在触角亚细胞结构中进行定位，以进一步了解中蜂 Orco 嗅觉受体在嗅觉识别中的作用，为研究中蜂嗅觉机理提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试中华蜜蜂 *A. cerana cerana* 按活框饲养技

术饲养于中国计量学院校内。材料选取卵期、幼虫期、蛹期和1日龄、6～18日龄(内勤蜂)、18日龄后(采集蜂)的工蜂；并用眼科镊取下各日龄工蜂的触角、头部(去除触角)、胸、腹、足和翅，液氮中冷冻1 d后置于－70℃保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

Trizol 总 RNA 提取试剂、RT-PCR 系统、pMD18-T 载体、SYBR Premix Ex Taq 荧光试剂等分子生物学试剂均购置 TaKaRa 公司，凝胶回收试剂盒购置于 Axygen 公司。新西兰大白兔购自杭州师范大学动物中心，抗兔 Alexa Fluor 488 免疫荧光染色试剂盒、免疫染色固定液、免疫染色洗涤液及免疫染色封闭液购置于上海碧云天公司。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

普通 PCR 仪、Bio-Rad iQ5 荧光定量 PCR 仪购置于 Bio-Rad 公司；NanoVue 超微量紫外分光光度计购置于 GE 公司；Lecia-CM1 900 冷冻切片机购置于 Leica 公司；LSM 710 激光共聚焦显微镜为 Zeiss 公司产品。

1.3 中蜂不同发育时期和不同组织的总 RNA 提取中蜂以及 cDNA 合成

根据 Total RNA 提取试剂说明书，提取不同发育时期供试材料和不同日龄工蜂各组织的总 RNA。1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性，采用紫外分光光度计测试其浓度后，按1 μg 总 RNA 量进行反转录合成第一链 cDNA，作为 PCR 以及荧光定量 PCR 分析的模板。

1.4 中蜂 Orco 基因的克隆、鉴定及序列测定

根据西方蜜蜂 *A. mellifera* 嗅觉受体基因 *AmelOrco* 序列(GenBank 登录号：NM_001134943)，利用 Primer Premier 5.0 软件设计中蜂 Orco 基因的引物，上游引物分别为5′-GCGGATCCATGAAGTTCAAGCAA-3′，5′-GCGAAGCTTTCACTTCAGTTGCA-3′。以反转录合成的第一链 cDNA 为模板，PCR 反应条件为94℃预变性3 min，每个循环程序是94℃ 1 min，50℃ 1 min，72℃ 1 min，进行35个循环，最后72℃保温10 min。PCR 扩增产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测，并回收产物，将凝胶回收的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接，转化入大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 中，经蓝白斑和氨苄鉴定，选取阳性重组菌，将阳性菌送至上海博尚测序公司测序。

1.5 序列分析以及分子进化树建立

利用 BlastX 软件(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)(Gertz *et al.*, 2006)进行序列相似性对比分析；通过在线预测软件 TMHMM v2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)(Käll *et al.*, 2004)对蛋白质序列进行跨膜序列分析，并利用 MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011)软件中的 Neighbor-Joining 法(Bootrap 为1 000次)构建系统进化树。

1.6 荧光定量 PCR

根据1.4中得到的测序结果设计中蜂 Orco 基因特异性引物，上游引物为5′-ACCAACGAAACGACCTA-3′，下游引物为5′-AACACCGAAGCAAAGAG-3′，用来进行不同发育时期和组织表达的荧光定量分析；根据西方蜜蜂 *A. mellifera* 的 *β-actin* 序列(GenBank 登录号为 XM_623378)设计内参引物 Be-Actin(上游引物5′-TCCTGCTATGTATGTCGC-3′，下游引物为5′-AGTTGCCATTTCCTGTTC-3′)。

荧光定量 PCR 采用25 μL 反应体系，12.5 μL SYBR Premix EX Taq 混合液，10 μmol/L 的上、下游引物各0.5 μL，以不同发育时期和组织的 cDNA 第一链为模板1 μL，ddH_2O 10.5 μL,混匀离心后放入 Real-time PCR 扩增仪上。PCR 的反应条件为95℃ 2 min 预变性，每个循环94℃ 30 s，54℃ 30 s，72℃ 50 s，进行45个循环。空白对照模板以 ddH_2O 代替；每一个样品重复3次。并且根据各样品对应的 *β-actin* 所得的 Ct 值，作为阳性对照，利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对各个样品进行校正，最终得到中蜂 Orco 基因在中蜂各发育时期和各组织的表达谱。

1.7 抗中蜂 Orco 多克隆抗体的制备、检测以及免疫荧光定位

根据1.4中跨膜序列保守区设计并合成中蜂 Orco 抗原免疫新西兰大白兔制备抗中蜂 Orco 多克隆抗体。具体步骤如下：首次免疫前，取1 mL 兔血作为以后实验的阴性对照，首次免疫将0.5 mL 蛋白溶液(含蛋白1 000 μg)至与等体积的弗氏完全佐剂充分混匀后，采用多点皮下注射的方法免疫兔子，以后每次免疫蛋白400 μg，共免疫6次后颈动脉取血获得免疫血清，并通过间接 ELISA 法测定所制备的多克隆抗体效价。免疫荧光定位时，以外出回巢时后足携满花粉的工蜂为采集蜂判定依据，将中蜂采集蜂触角在冷冻切片机中进行切片(约3 μm 厚)，用1 mL 免疫染色固定液室温固定30 min 后，弃去固定液，用免疫染色洗涤液洗3次，每次3 min；加入1 mL 免疫染色封闭液室温封闭1 h；弃去封闭液，加入1 mL 抗中蜂 Orco 多克隆抗体(体积比1∶500)，4℃过夜；用免疫染色洗涤液洗3次

后加入荧光 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG 二抗（体积比 1∶1 500）室温避光作用 1 h；免疫染色洗涤液洗 3 次后加入抗荧光淬灭封片液封片后，在激光共聚焦显微镜 488 nm 激发波长下观察。

2　结果与分析

2.1　中蜂 *Orco* 基因的序列测定以及编码蛋白的跨膜区域分析

以中蜂触角 cDNA 为模板 PCR 扩增后得到 1 400 bp左右的条带，通过割胶回收后连接到 pMD18-T 载体上，并转化入大肠杆菌 *E. coli* DH5α 中，阳性重组质粒测序所得序列表明其编码框全长为 1 434 bp，推测编码 477 个氨基酸，分子量为 53.86 kD，等电点为 7.662，其中含有 189 个疏水性氨基酸，132 个极性氨基酸。此序列在 NCBI 核酸库中进行 BlastX 分析，选取佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus* CfloOrco、黑腹果蝇 *D. melanogaster* DmelOrco、烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta* HassOrco 等不同目的昆虫的 Orco 蛋白进行同源比对，结果发现中蜂 Orco 与其他昆虫的 Orco 嗅觉受体具有很高的相似性，与西方蜜蜂 AmelOrco 序列的一致性高达 99.37%，与膜翅目其他昆虫如佛罗里达弓背蚁 CfloOrco 以及丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* NvitOrco 的一致性分别为 73.35% 和 68.24%，与鞘翅目的赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* TcasOrco 的一致性达到 75.33%，与鳞翅目烟实夜蛾 HassOrco 的一致性达到 74.41%，与双翅目黑腹果蝇 DmelOrco 的一致性也达到 73.95%，且所有蛋白序列在 C 端均含有一个高度保守的区域（图 1）。由此可见昆虫的 Orco 受体家族基因有很强的同源性及高保守性，是一类与传统 Ors 不同的非常保守的基因（Robertson and Wanner, 2006）。故将得到的该条序列命名为 *AcerOrco*，并在 NCBI 中进行登录（GenBank ID：JF968610.1，Protein ID：AEN71859.1）。

为了研究 AcerOrco 与其他昆虫的进化关系，选取膜翅目、鞘翅目、鳞翅目、双翅目各个目中具有代表性的 Orco 受体家族基因，采用 MEGA 5.0 软件中的邻位相连法 Neighbor-joining 进行 1 000 次重复计算后构建系统进化树（图 2）。由图 2 可知，15 个 Orco 嗅觉受体分为两个大的分支，AcerOrco 与同为膜翅目的其他昆虫如非传粉榕小蜂 *Apocrypta bakeri* AbakOrco，西方蜜蜂 AmelOrco，切叶蚁 *Acromyrmex echinatior* AechOrco 等与鞘翅目的赤拟谷盗 TcasOrco 等在一个簇，而双翅目与鳞翅目的昆虫处于一个簇，这说明膜翅目与鞘翅目的 Orco 嗅觉受体在亲缘关系上较亲近。

AcerOrco 氨基酸序列经 TMHMMv2.0 软件跨膜结构分析表明 AcerOrco 含有 7 个跨膜结构域（图 3），其在氨基酸中的位置见图 1，可以发现每两个跨膜结构域之间都含有一段在细胞膜外的亲水序列，它们的氨基酸顺序分别为第 64 ~ 72、154 ~ 187、362 ~ 380、474 ~ 477 位，且在第 154 ~ 187 位氨基酸序列处的亲水序列是最长的（图 1 箭头所指区域），根据此处亲水区设计并合成 Glu-Thr-Thr-Tyr-Val-Glu-lle-Pro-Arg-Leu-Met-Val-Arg-Ser 多肽序列，用于制备 AcerOrco 气味受体蛋白的多克隆抗体。

2.2　*AcerOrco* 基因在中蜂不同发育时期以及不同组织的表达谱

以 1 日龄的工蜂触角的 *AcerOrco* 表达量为基准，研究其在中蜂不同发育时期以及不同组织的表达情况。如图 4 所示，在不同发育时期中，中蜂卵、幼虫和蛹期均有 *AcerOrco* 的表达，但是表达量极低，而 1 日龄的工蜂触角中 *AcerOrco* 表达量是中蜂卵中的 2 800 倍，是蛹中表达量的 380 倍，表明工蜂在羽化后 *AcerOrco* 快速启动了高丰度的表达。另一方面，在中蜂不同器官中，1 日龄的工蜂和内勤蜂（6 ~ 18 日龄）中 *AcerOrco* 只在触角和足中有表达，且在 1 日龄的触角和足中表达量相差极高，触角中 *AcerOrco* 表达量是足中的 2 500 倍，而内勤蜂在触角和足表达量相差不大；在采集蜂（约 18 日龄以后）中，在其触角、头（不含触角）、胸、腹和翅中均有一定量的表达。

2.3　AcerOrco 免疫荧光定位分析

通过间接 ELISA 的方法检测到多克隆抗体的效价，结果表明，自制的抗 AcerOrco 兔血清的效价可达 1∶6 400 以上。利用冷冻切片结合间接免疫荧光技术，对 AcerOrco 在中蜂采集蜂的触角感器进行定位，用未免疫的兔血清做为阴性对照以制备的抗 AcerOrco 兔血清为一抗，以 AlexaFluor 488 标记山羊抗兔 IgG 为二抗，在激光共聚焦显微镜下以 488 nm 波长进行激发，显示 AceOrco 在中蜂工蜂触角端节表达和定位情况。如图 5 所示，采集蜂触角鞭节中显著地分布着明亮且特异性的绿色荧光，且标记荧光的形状为杆状（常成对出现）的毛形感器（sensilla trihodea）内的外部树突神经元（图 5 白色箭头所指）或圆盘状的板形感器（sensillaplacodea）

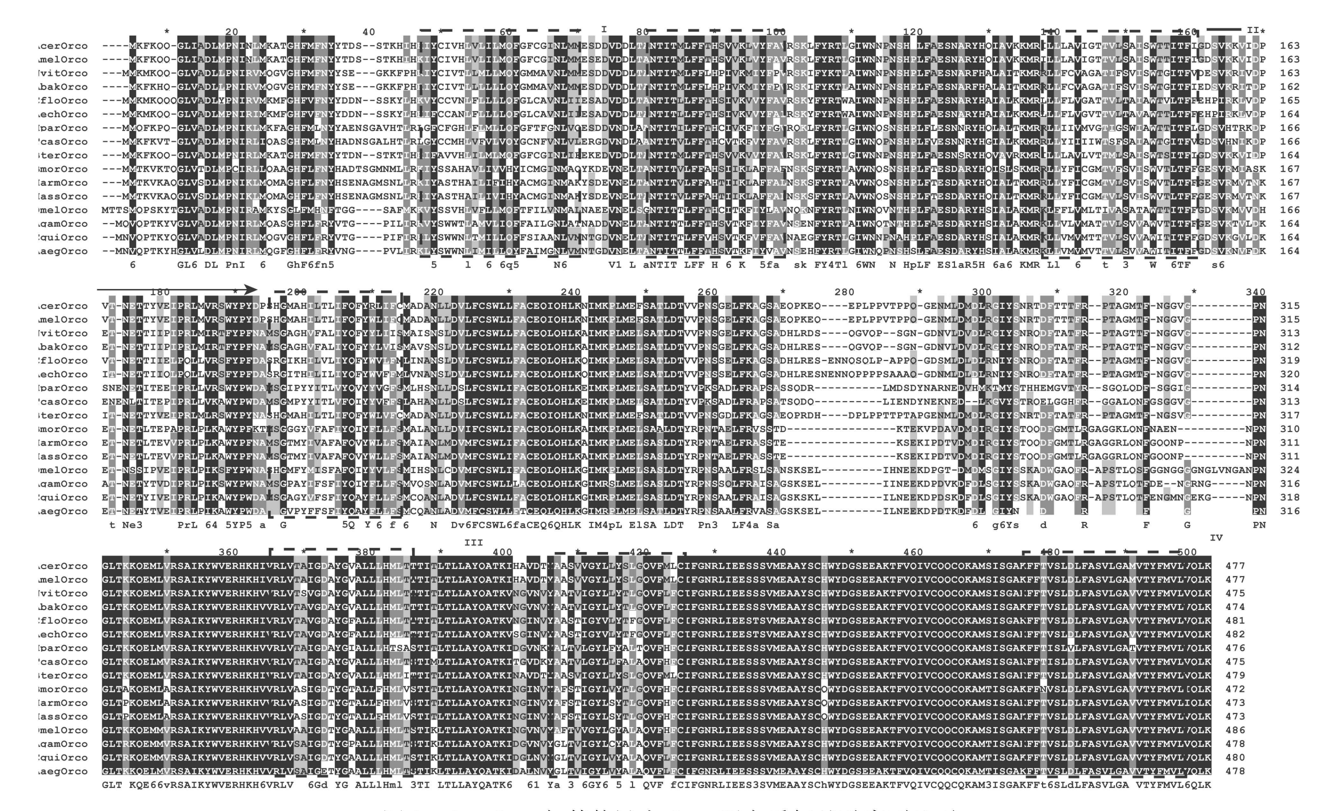


图 1 AcerOrco 与其他昆虫 Orco 蛋白质氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of AcerOrco with Orco proteins from other insects

虚线方框为 7 个跨膜结构域，箭头为拟设计合成多肽抗原设计区，Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ分别为 AcerOrco 4 个胞外亲水性区域。Seven transmembrane regions are marked with the dashed box, and the synthetic peptide antigen area is marked with the arrow. Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and Ⅳ are the four cell outer hydrophilic regions of AcerOrco.

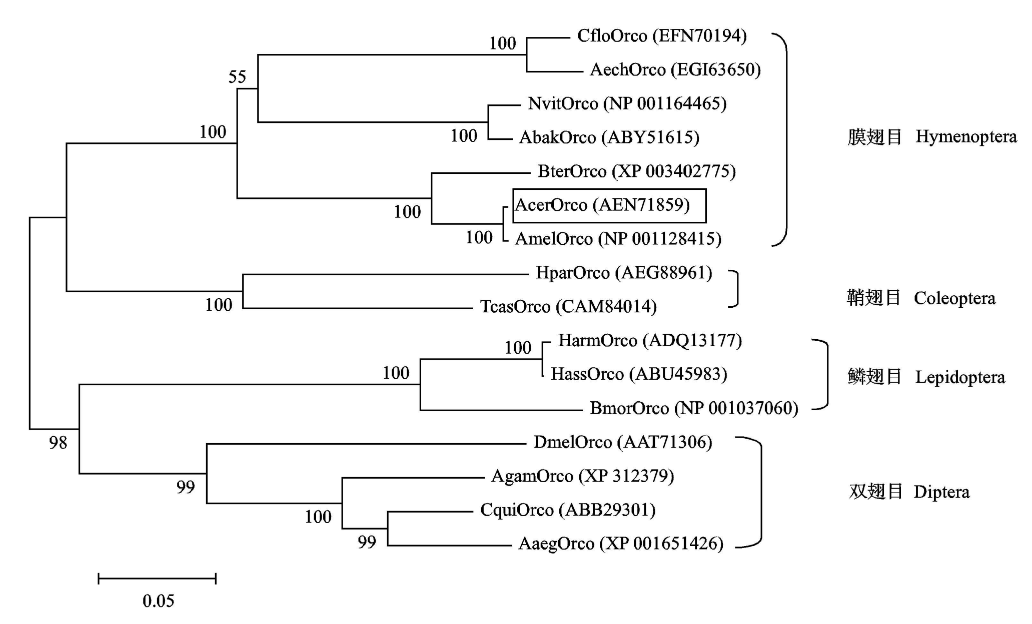


图 2 AcerOrco 与其他昆虫非传统型气味受体系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of AcerOrco and atypical Ors from other insects based on amino acid sequences

CfloOrco：佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*；AechOrco：切叶蚁 *Acromyrmex echinatior*；NvitOrco：丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*；AbakOrco：非传粉榕小蜂 *Apocrypta bakeri*；BterOrco：熊蜂 *Bombus terrestris*；AcerOrco：中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*；AmelOrco：西方蜜蜂 *Apis mellifera*；HparOrco：暗黑齿爪鳃金龟 *Holotrichia parallela*；TcasOrco：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*；HarmOrco：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*；HassOrco：烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta*；BmorOrco：家蚕 *Bombyx mori*；DmelOrco：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*；AgamOrco：冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*；CquiOrco：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*；AaegOrco：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*.

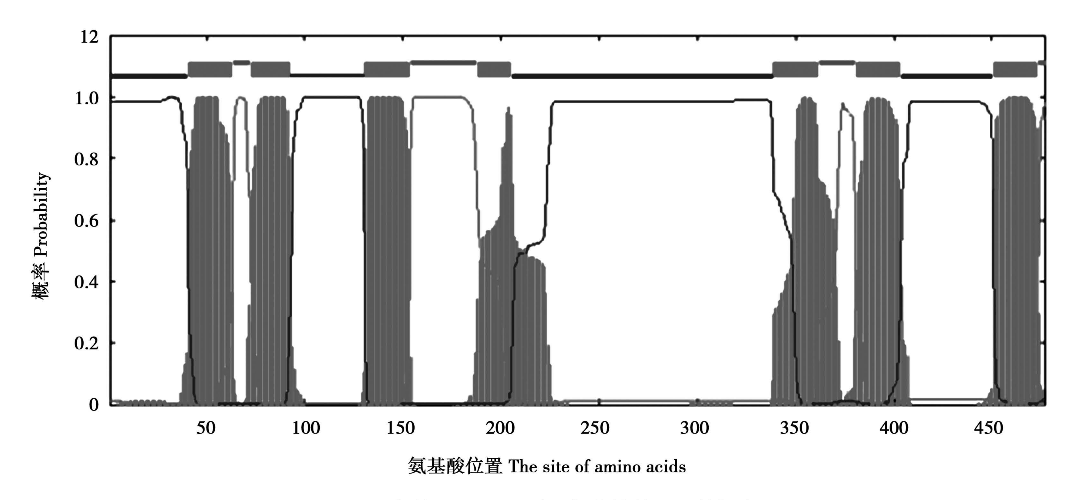


图 3　中蜂 AcerOrco 的跨膜结构预测结果

Fig. 3　Predicted transmembrane domains of AcerOrco in *Apis cerana cerana*

第 41 ~ 63, 73 ~ 92, 131 ~ 153, 188 ~ 205, 339 ~ 361, 381 ~ 403 和 451 ~ 473 位氨基酸处为 7 个跨膜区 Seven transmembrane domains (the amino acids at position 41 – 63, 73 – 92, 131 – 153, 188 – 205, 339 – 361, 381 – 403, and 451 – 473); 第 64 ~ 72, 154 ~ 187, 362 ~ 380 和 474 ~ 477 位氨基酸处为 4 个细胞外亲水区 Four extracellular hydrophilic regions (the amino acids at position 64 – 72, 154 – 187, 362 – 380, and 474 – 477).

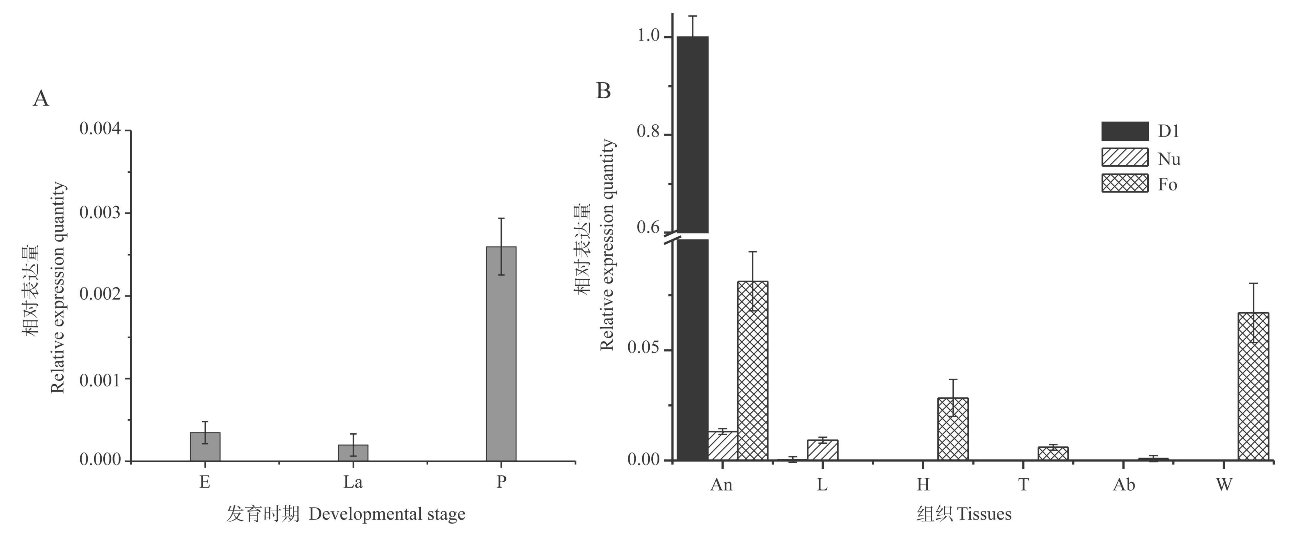


图 4　*AcerOrco* 在中蜂不同发育时期(A)以及不同组织(B)的相对表达情况

Fig. 4　Relative expression level of *AcerOrco* at different stages (A) and in different tissues (B) of *Apis cerana cerana*

图中数据(平均值 ± *SD*)是以 1 日龄的工蜂触角含量为基准。Data (mean ± *SD*) were normalized to the value in antenna of the 1 day-old worker. E: 卵 Egg; La: 幼虫 Larva; P: 蛹 Pupa; An: 触角 Antenna; L: 足 Legs; H: 头(去除触角)Head without antenna; T: 胸 Thorax; Ab: 腹 Abdomen; W: 翅 Wings; D1: 1 日龄工蜂 1 day-old worker; Nu: 内勤蜂 Nurse; Fo: 采集蜂 Forager.

内的树突神经元(图 5 红色箭头所指)。此外 AcerOrco 在触角鞭节的末端第 1 亚节中大量表达(图5: A), 而触角鞭节中部第 3 亚节中仅在上下两侧呈规律性分布, 但是数量远不及前者(图 5: B), 这应该与工蜂触角不同节所具有的嗅觉感器的种类、表达和定位分布有密切的联系。

3　讨论

本研究首次通过 RT-PCR 技术获得中蜂嗅觉受体基因的全长序列为 1 434 bp, GenBank 登录号为 JF968610.1, 分析表明 AcerOrco 含有 7 个跨膜区域, 其氨基酸 N 端是在细胞膜内的而 C 端是在细胞膜外的亲水区, 与果蝇的嗅觉受体 DmelOrco 的 N 末端在膜内的结构类似(Benton *et al*., 2006), 属于昆虫 Orco 受体家族。本文选取膜翅目、鞘翅目、鳞翅目和双翅目 4 个目中具有代表性的昆虫 Orco 受体与 AcerOrco 的氨基酸序列进行多序列联配比对, 发现不同昆虫的Orco具有高度的保守性,特别是

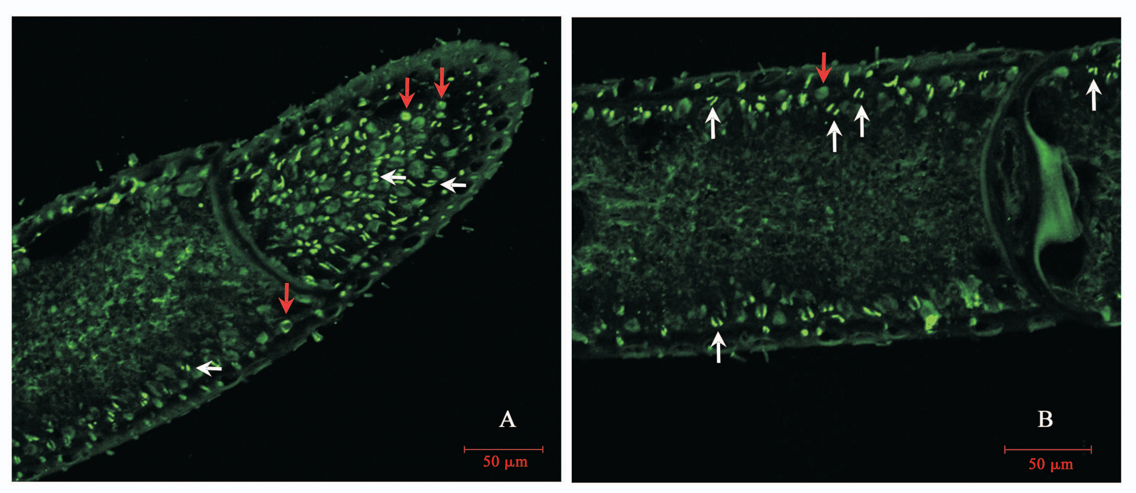


图 5 AcerOrco 在中蜂采集蜂触角中的免疫荧光定位

Fig. 5 Immunofluorescence localization of AcerOrco on the antenna of *Apis cerana cerana* forager

A：激光共聚焦显微镜下触角鞭节第 1 亚节 The 1st flagellar segment of antenna under laser scanning confocal microscope；B：激光共聚焦显微镜下触角鞭节第 3 亚节 The 3rd flagellar segment of antenna under laser scanning confocal microscope. 白色箭头所指为毛形感器的嗅觉外部树突神经元，红色箭头所指为板形感器内的树突神经元。White arrows show the outer dendrite (OD) neurons in sensilla trihodea, while the red arrows show the dendrites of sensilla placodea. 标尺 Scale bar = 50 μm.

蛋白质的 C 末端几乎完全一致，这与以往文献中的报道(Miller and Tu，2008)非常类似。其中 AcerOrco 与西方蜜蜂 AmelOrco 序列的相似性高达 99.37%，此外对 AcerOrco 的跨膜区域情况进行预测，发现其具备跨膜七螺旋结构，并且在其第 3 和第 4 个跨膜区间具有一个特殊的细胞外亲水区域，据此合成了特异性的 14 多肽序列作为抗原以实现 AcerOrco 在触角上的亚细胞定位。

Orco 受体家族主要在昆虫的嗅觉神经元上表达，而昆虫的嗅觉神经元存在于感受器中，昆虫的头部的触角、下颚须以及喙中都存在大量的嗅觉感受器(Vosshall *et al*., 2000)，还有一些感受器则分布于足、前翅边缘以及产卵器上(Stocker，1994)。本研究对 *AcerOrco* 的表达谱分析发现，羽化是其表达的一个关键的时间点，羽化前的卵期、幼虫期以及蛹期 *AcerOrco* 基本维持比较极低丰度的表达，直至羽化；之后 *AcerOrco* 在 1 日龄的触角中有高丰度表达，直到采集蜂阶段，*AcerOrco* 在包括触角在内的其他器官中也呈高丰度的表达。由于蜜蜂的社会行为与其发育阶段密切相关，如 18 日龄以前为内勤蜂主要以酿蜜、哺育幼虫和清理巢房等活动为主，而 18 日龄后的采集蜂主要以外出采集花蜜、花粉和水分等活动为主(Beshers *et al*., 2001)。本研究结果表明工蜂 *AcerOrco* 的时空表达丰度与其嗅觉系统和行为的成熟度密不可分，并暗示其在中蜂嗅觉系统和功能发育过程中的重要调节作用。

利用亚细胞定位如原位杂交和免疫荧光等手段来研究 Ors 在昆虫嗅觉器官中的表达是一种非常有效的方法，如 Ors 在果蝇的触角、下颚须以及幼虫中的嗅觉神经元中表达(Larsson *et al*., 2004)。在西方蜜蜂的 AmelOrco 的原位杂交试验中，也已经发现 AmelOrco 可能在毛形或板形感器中表达(Krieger *et al*., 2003)，由于毛形感器和板形感器是蜜蜂触角上重要的嗅觉感受器(Dietz and Humphreys，1971)，也间接证明 Orco 与蜜蜂的嗅觉功能密切相关。在本研究中，通过免疫荧光的方法，对中蜂工蜂触角的冷冻切片中的 AcerOrco 蛋白进行定位，得到了与 AmelOrco 相似而又更详细的结果。一方面从采集蜂触角鞭节中分布着明亮且特异性的杆状绿色荧光，以及蜜蜂触角的感器分布规律和成对出现的特征，我们推测 AcerOrco 主要存在于嗅觉感器内部的外部树突神经元上，当然也有部分 AcerOrco 表达于板形感器，荧光显示为圆盘型；另一方面由于蜜蜂触角末端的嗅觉功能非常灵敏，所以 AcerOrco 在触角末端的分布要显著地比其他亚节密集，此外 AcerOrco 在触角末端分布密集的板形感器上有表达也印证了这一点。不同昆虫间 Orco 嗅觉受体具有高度保守性，但是其要与其他传统型嗅觉受体 Ors 组成“Orco-Ors”二聚体才能共同发挥嗅觉识别的生理作用(Sakurai *et al*., 2004)，故下一步研究主要基于与中蜂独特嗅觉行为相关的 Ors 的鉴定和功能研究。此外在中蜂嗅觉信号传递

链中 AcerOrco 受体蛋白也可能与气味结合蛋白 OBPs 产生相互作用，能够系统地阐释和完善中蜂嗅觉信息识别、传递的生理生化和分子机制，并提供一定的理论依据。

参考文献（References）

Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB, 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol.*, 4(2): 240 – 257.

Beshers S, Huang Z, Oono Y, Robinson G, 2001. Social inhibition and the regulation of temporal polyethism in honey bees. *Journal of Theoretical Biology*, 213: 461 – 479.

Dietz A, Humphreys WJ, 1971. Scanning electron microscopic studies of antennal receptors of the worker honey bee, including sensilla campaniformia. *Annals of the Entomological Society of America*, 64(4): 919 – 925.

Gertz EM, Yu YK, Agarwala R, Schäffer A, Altschul S, 2006. Composition-based statistics and translated nucleotide searches: improving the tblastn module of blast. *BMC Biology*, 4: 41.

Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL, 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of Molecular Biology*, 338: 1027 – 1036.

Krieger J, Klink O, Mohl C, Raming K, Breer H, 2003. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 189: 519 – 526.

Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB, 2004. *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43: 703 – 714.

Li HL, Lou BG, Cheng JA, Gao QK, 2007. The chemosensory protein of Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*: molecular cloning of cDNA, immunocytochemical localization and expression. *Chinese Science Bulletin*, 52(10): 1355 – 1364.

Li HL, Ni CX, Yao R, Gao QK, Shang HW, 2010. Molecular cloning, characterization, and expression pattern of chemosensory protein gene (*Acer-CSP1*) in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(9): 962 – 968. [李红亮，倪翠侠，姚瑞，高其康，商晗武，2010. 中华蜜蜂化学感受蛋白基因 *Acer-CSP1* 克隆与表达特征分析. 昆虫学报，53(9): 962 – 968]

Li HL, Nie WM, Gao QK, Cheng JA, 2008. Cloning of cDNA encoding odorant binding protein ASP2 in working bee's antenna of *Apis cerana cerana* and its prokaryotic expression. *Scientia Agricultura Sinica*, 41(3): 933 – 938. [李红亮，聂文敏，高其康，程家安，2008. 中华蜜蜂气味结合蛋白 ASP2 cDNA 的克隆及原核表达. 中国农业科学，41(3): 933 – 938]

Li HL, Zhang LY, Ni CX, Shang HW, 2011. Molecular binding characterization with chemical ligands of a chemosensory protein AcerCSP3 in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* Fabricius (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(3): 259 – 264. [李红亮，张林雅，倪翠侠，商晗武，2011. 中华蜜蜂化学感受蛋白 AcerCSP3 的配基结合功能分析. 昆虫学报，54(3): 259 – 264]

Li HL, Zhang YL, Gao QK, Cheng JA, Lou BG, 2008. Molecular identification of cDNA, immunolocalization, and expression of a putative odorant-binding protein from an Asian honeybee, *Apis cerana cerana*. *Journal of Chemical Ecology*, 34: 1593 – 1601.

Li X, Liu JJ, Gong L, Chen Y, Zhong GH, 2011. Cloning and expression of odorant receptor gene *PlxyOr83b* from *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(5): 502 – 507. [李珣，刘晶晶，龚亮，陈永，钟国华，2011. 小菜蛾气味受体蛋白 PlxyOr83b 基因的克隆及表达. 昆虫学报，54(5): 502 – 507]

Lu B, Wang N, Xiao J, Xu Y, Murphy RW, Huang D, 2009. Expression and evolutionary divergence of the non-conventional olfactory receptor in four species of fig wasp associated with one species of fig. *BMC Evolutionary Biology*, 9: 43.

Lundin C, Kaull L, Kreher SA, Kapp K, Sonnhammer EL, Carlson JR, von Heijne G, Nilsson IM, 2007. Membrane topology of the *Drosophila* OR83b odorant receptor. *FEBS Letters*, 581: 5601 – 5604.

Miller R, Tu Z, 2008. Odorant receptor c-terminal motifs in divergent insect species. *Journal of Insect Science*, 8: 53.

Mombaerts P, 1999. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science*, 286(5440): 707 – 711.

Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 1658 – 1676.

Qiao Q, Li HC, Yuan GH, Guo XR, Luo MH, 2010. Cloning and expression analysis of cDNA encoding Or83b-like receptor from *Helicoverpa assulta*. *Agricultural Sciences in China*, 9(7): 1001 – 1007.

Rützler M, Zwiebel LJ, 2005. Molecular biology of insect olfaction: recent progress and conceptual models. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 191: 777 – 790.

Robertson HM, Wanner KW, 2006. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Research*, 16: 1395 – 1403.

Sakurai T, Nakagawa T, Mitsuno H, Mori H, Endo Y, Tanoue S, Yasukochi Y, Touhara K, Nishioka T, 2004. Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkmoth *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47): 16653 – 16658.

Sánchez-Gracia A, Vieira FG, Rozas J, 2009. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity*, 103: 208 – 216.

Stocker RF, 1994. The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a rewiew. *Cell and Tissue Research*, 275: 3 – 26.

Su CY, Menuz K, Carlson JR, 2009. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. *Cell*, 139: 45 – 59.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731 – 2739.

Vosshall LB, Hansson BS, 2011. A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor. *Chemical Senses*, 36: 497 – 498.

Vosshall LB, Wong AM, Axel R, 2000. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*, 102: 147 – 159.

Vosshall LB, Amrein H, Morozovp S, Rzhetsky A, Axel R, 1999. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 96: 725 – 736.

Wang GR, Wu KM, Su HH, Guo YY, 2005. Gene cloning and tissue-specific expression of an olfactory receptor in *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomologica Sinica*, 48(6): 823 – 828. [王桂荣, 吴孔明, 苏宏华, 郭予元, 2005. 棉铃虫嗅觉受体基因的克隆及组织特异性表达. 昆虫学报, 48(6): 823 – 828]

Xia Y, Zwiebel LJ, 2006. Identification and characterization of an odorant receptor from the West Nile virus mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 169 – 176.

Xiu WM, Zhang YF, Yang DL, Dong SL, Liu YS, 2010. Molecular cloning and sequence analysis of two cDNA genes of two new Lepidoptera OR83b orthologue chemoreceptors. *Scientia Agricultura Sinica*, 43(3): 618 – 625. [修伟明, 张逸凡, 杨殿林, 董双林, 刘玉升, 2010. 2 个新的鳞翅目 OR83b 类化感蛋白基因的克隆和序列分析. 中国农业科学, 43(3): 618 – 625]

Yan WY, Le Conte Y, Beslay D, Zeng ZJ, 2009. Identification of brood pheromone in Chinese honeybee [*Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)]. *Scientia Agricultura Sinica*, 42(6): 2250 – 2254. [颜伟玉, Le Conte Y, Beslay D, 曾志将, 2009. 中华蜜蜂幼虫信息素鉴定. 中国农业科学, 42(6): 2250 – 2254]

(责任编辑: 赵利辉)